

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Patentschrift
⑪ DE 3590766 C2

- ②1 Deutsches Aktenzeichen: P 35 90 766.5-41
②6 PCT Aktenzeichen: PCT/CH85/00099
②7 PCT Veröffentlichungs-Nr.: WO 86/05803
②6 PCT Anmeldetag: 17. 8. 85
②7 PCT Veröffentlichungstag: 9. 10. 86
④3 Veröffentlichungstag der PCT Anmeldung
in deutscher Übersetzung: 23. 4. 87
④5 Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 10. 1. 91

⑤1 Int. Cl. 5:
C 12 N 15/00
C 12 P 21/00
C 07 K 15/04
A 61 K 37/02

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

③0 Unionspriorität: ③2 ③3 ③1
30.03.85 CH 01379/85-8

⑦3 Patentinhaber:
Ballivet, Marc, Genf/Genève, CH; Kauffman, Stuart
Alan, Bryn Mawr, Pa., US

⑦4 Vertreter:
Haft, U., Dipl.-Phys., 8000 München; Berngruber, O.,
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., 8232 Bayerisch Gmain;
Czybulka, U., Dipl.-Phys., Pat.-Anwälte, 8000
München

⑥2 Teil in: P 35 46 807.6
P 35 46 806.8

⑦2 Erfinder:
gleich Patentinhaber

⑤6 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:
Genetic Engineering, Vol.1, ed.;
SETLOW, J.K., und HOLLAENDER, A.: Plenum Press,
New York und London, 1979, S.15-36;

⑤4 Verfahren zur Herstellung von Peptiden, Polypeptiden oder Proteinen

DE 3590766 C2

DE 3590766 C2

Beschreibung

Die Erfindung betrifft das im Anspruch 1 angegebene Verfahren zur Herstellung von Peptiden, Polypeptiden oder Proteinen. Die Ansprüche 2 bis 22 betreffen Ausgestaltungen dieses Verfahrens, sowie Anspruch 23 dessen Anwendung.

Dabei wird nach der Methode der rekombinanten DNA vorgegangen. Bei der bekannten rekombinanten DNA-Technologie wird zur Herstellung des Gens, das in die Wirtszellen eingebracht wird, entweder natürliche DNA zerschnitten, um fremde DNA-Fragmente zu bilden, oder es wird eine bestimmte fremde DNA aus einzelnen Nukleotiden synthetisiert. Die fremde DNA, aus dem das Gen hergestellt wird, das in die Wirtszellen eingebracht wird, weist also in beiden Fällen eine definierte Nukleotid-Sequenz auf, durch die ein bekanntes Peptid, Polypeptid oder Protein exprimiert werden soll.

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem Peptide, Polypeptide oder Proteine erzeugt werden können, die Eigenschaften aufweisen, die denen der in der Natur vorkommenden Peptide, Polypeptide oder Proteine überlegen sind.

Dies wird erfindungsgemäß mit dem im Anspruch 1 gekennzeichneten Verfahren erreicht. In den Ansprüchen 2 bis 22 sind bevorzugte Ausgestaltungen des erfindungsgemäßen Verfahrens wiedergegeben, und im Anspruch 23 eine vorteilhafte Anwendung desselben.

Nach der Erfindung bestehen die Gene zumindest teilweise aus stochastischen synthetischen Polynukleotiden. Damit werden stochastische Gene oder Fragmente von stochastischen Genen in einer Weise hergestellt, daß nach Transkription und Translation der Gene eine große Zahl (in der Größenordnung von mindestens 10 000) vollständig neuer Proteine in Gegenwart der Wirtszellen (bakterieller oder eukaryontischer) gebildet wird, die diese Gene, die zur Expression dieser Proteine fähig sind, enthalten, um danach eine Selektion oder Screening unter diesen Klonen vorzunehmen, um zu bestimmen, welche von ihnen Proteine mit den gewünschten Eigenschaften produzieren, z. B. struktureller, enzymatischer, katalytischer, antigener, pharmakologischer oder Ligandeneigenschaften, und allgemeiner, chemischer, biochemischer, biologischer usw. Eigenschaften.

Es ist deshalb klar, daß die Erfindung eine sehr große Zahl von Anwendungen auf sehr vielen Gebieten der Wissenschaft, Industrie und Medizin eröffnet.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird also so vorgegangen, daß man gleichzeitig, im gleichen Medium, Gene herstellt, die zumindest teilweise aus synthetischen, stochastischen Polynukleotiden zusammengesetzt sind, daß man die so erhaltenen Gene in Wirtszellen einbringt, daß man die unabhängigen Klone der transformierten Wirtszellen, die diese Gene enthalten, gleichzeitig in einer solchen Weise kultiviert, um die stochastischen Gene zu klonieren und die Bildung von Proteinen zu erhalten, die durch jedes dieser stochastischen Gene exprimiert sind, daß man die Selektion und/oder das Screening der Klone transformierter Wirtszellen in einer Weise durchführt, um diejenigen Klone zu identifizieren, die Peptide, oder Polypeptide mit mindestens einer gewünschten Aktivität bilden, daß man danach die so identifizierten Klone isoliert und daß man diese kultiviert, um mindestens ein Peptid, Polypeptid oder Protein mit dieser Eigenschaft zu produzieren.

In einer ersten Ausführungsform dieses Verfahrens werden stochastische Gene hergestellt durch stochasti-

sche Copolymerisation der vier Arten von Deoxyphosphonukleotiden A, C, G und T, von den zwei Enden eines anfänglich linearisierten Expressionsvektors, gefolgt von der Bildung kohäsiver Enden in einer solchen Weise, um einen stochastischen ersten Strang von DNA zu bilden, der von einem Molekül des Expressionsvektors gebildet wird, das zwei stochastische Sequenzen, dessen 3'-Enden komplementär sind, besitzt, gefolgt von der Synthese des zweiten Stranges der stochastischen DNA.

In einer zweiten Ausführungsform dieses Verfahrens werden stochastische Gene hergestellt durch Copolymerisation von Oligonukleotiden ohne kohäsive Enden, in einer Weise, um Fragmente stochastischer DNA zu bilden, gefolgt von einer Ligierung dieser Fragmente an einen vorher linearisierten Expressionsvektor.

Der Expressionsvektor kann ein Plasmid sein, insbesondere ein bakterielles Plasmid. Hervorragende Ergebnisse wurden unter Verwendung des Plasmids pUC8 als Expressionsvektor erhalten.

Der Expressionsvektor kann auch eine virale DNA oder ein Hybrid eines Plasmids und einer viralen DNA sein.

Die Wirtszellen können prokaryontische Zellen wie z. B. HB 101 und C 600 oder eukaryontische Zellen sein.

Wenn das Verfahren gemäß der zweiten oben erwähnten Ausführungsform verwendet wird, ist es möglich, Oligonukleotide zu verwenden, die eine Gruppe palindromischer Octamerer bilden.

Insbesondere gute Ergebnisse werden erhalten unter Verwendung der folgenden Gruppen von palindromischer Octamerer:

```

5' CGAATTCC 3'
5' GGTCCACC 3'
5' CAAGCTTC 3'
5' CCATATCG 3'
5' CATCGATC 3'

```

Es ist auch möglich, Oligonukleotide zu verwenden, die eine Gruppe palindromischer Heptamerer bilden.

Sehr gute Ergebnisse werden erhalten unter Verwendung der folgenden Gruppe palindromischer Heptamerer:

```

5' XTCCGCA 3'
5' XCTCCAG 3'
5' RGGTACC 3'

```

worin X = A, G, C oder T und R = A oder T ist.

Nach einer Methode, um diese Verfahren zu verwenden, die besonders vorteilhaft ist, isoliert und reinigt man die transformierende DNA der Plasmide aus einer Kultur unabhängiger Klone der transformierten Wirtszellen, die nach den obigen Verfahren erhalten wurden, dann wird die gereinigte DNA durch mindestens ein Restriktionsenzym geschnitten, das spezifischen enzymatischen Schnittstellen entspricht, die in den palindromischen Octameren oder Heptameren vorhanden sind, aber in dem verwendeten Expressionsvektor fehlen; auf dieses Schneiden folgt Inaktivierung des Restriktionsen-

zyms, dann behandelt man das Ensemble der so erhaltenen linearisierten stochastischen DNA-Fragmente gleichzeitig mit T4-DNA-Ligase in einer solchen Weise, um ein neues Ensemble von DNA zu bilden, das neue stochastische Sequenzen enthält, wobei dieses neue Ensemble deshalb eine Zahl stochastischer Gene enthalten kann, die größer ist als die Zahl der Gene in dem anfänglichen Ensemble. Dieses neue Ensemble transformieren der DNA verwendet man dann zur Transformierung der Wirtszellen und Klonierung dieser Gene, und danach wendet man ein Screening und/oder eine Selektion an und isoliert die neuen Klone der transformierten Wirtszellen, und schließlich werden diese kultiviert, um mindestens ein neues Peptid, Polypeptid oder Protein zu produzieren.

Die Eigenschaft, die als Kriterium zur Selektion der Klone von Wirtszellen dient, kann die Fähigkeit der in einem bestimmten Klon produzierten Peptide, Polypeptide oder Proteine sein, eine bestimmte chemische Reaktion zu katalysieren.

Zum Beispiel kann zur Herstellung verschiedener Peptide, Polypeptide oder Proteine diese Eigenschaft die Fähigkeit sein, eine Folge von Reaktionen zu katalysieren, die von einer anfänglichen Gruppe chemischer Verbindungen zu mindestens einer Zielverbindung führt.

Mit dem Ziel zur Herstellung eines Ensembles, das aus einer Vielzahl von Peptiden, Polypeptiden oder Proteinen aufgebaut ist, die reflexiv autokatalytisch sind, kann diese Eigenschaft die Fähigkeit sein, die Synthese des gleichen Ensembles aus Aminosäuren und/oder Oligopeptiden in einem geeigneten Milieu zu katalysieren.

Diese Eigenschaft kann auch die Fähigkeit sein, selektiv die biologischen oder chemischen Eigenschaften einer bestimmten Verbindung zu modifizieren, z. B. die Fähigkeit, die katalytische Aktivität eines Polypeptids selektiv zu modifizieren.

Diese Eigenschaft kann auch die Fähigkeit sein, mindestens eine biologische Funktion von mindestens einer biologisch aktiven Verbindung zu simulieren, inhibieren oder zu modifizieren, die z. B. ausgewählt ist aus den Hormonen, Neurotransmittern, Adhäsionsfaktoren, Wachstumsfaktoren und spezifischen Regulatoren der DNA-Replikation und/oder Transkription und/oder Translation von RNA.

Diese Eigenschaft kann gleichermaßen die Fähigkeit der Peptide, Polypeptide oder Proteine sein, sich an einen bestimmten Liganden zu binden.

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltenen Peptide, Polypeptide oder Proteine können zur Bestimmung und/oder Titration eines Liganden verwendet werden.

Gemäß einer besonders bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform ist das Kriterium zur Selektion der Klone transformierter Wirtszellen die Fähigkeit dieser Peptide, Polypeptide oder Proteine, die Wirkung eines biologisch aktiven Moleküls zu simulieren oder zu modifizieren, z. B. eines Proteins. Dabei wird das Screening und/oder die Selektion für Klone transformierter Wirtszellen, die mindestens ein Peptid, Polypeptid oder Protein mit diesen Eigenschaften produzieren, durchgeführt, indem man Antikörper gegen das aktive Molekül herstellt. Diese Antikörper werden nach ihrer Reinigung verwendet, um die Klone, die dieses Peptid, Polypeptid oder Protein enthalten, zu identifizieren. Dann erfolgt das Kultivieren der so identifizierten Klone sowie das Abtrennen und Reinigen der durch diese Klone produzierten Peptide, Polypeptide oder Proteine.

Schließlich unterwirft man das Peptid, Polypeptid oder Protein einer in-vitro-Untersuchung, um sicherzustellen, daß es die Fähigkeit besitzt, die Wirkung des Moleküls zu simulieren oder zu modifizieren.

Gemäß einer anderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Eigenschaft, die als Kriterium der Selektion dient das Vorhandensein von mindestens einem Epitop, das ähnlich ist zu einem der Epitope eines bestimmten Antigens.

Die Erfindung ermöglicht es, nach dem oben spezifizierten Verfahren Peptide, Polypeptide oder Proteine zu erhalten, die als chemotherapeutisch wirksame Substanzen verwendbar sind.

Inbesondere erlaubt die Erfindung in dem Fall, wenn das Antigen EGF ist, die Herstellung von Polypeptiden, die zur chemotherapeutischen Behandlung von Hautkrebs brauchbar sind.

Gemäß einer Abänderung des Verfahrens identifiziert und isoliert man die Klone transformierter Wirtszellen die Peptide, Polypeptide oder Proteine mit den gewünschten Eigenschaften produzieren, durch Affinitätschromatographie gegen Antikörper, die einem Protein, da durch den natürlichen Teil des DNA-Hybrids exprimiert ist, entsprechen.

Wenn der natürliche Teil der Hybrid-DNA ein Gen enthält, das β -Galactosidase exprimiert, kann man z. B. die Klone der transformierten Wirtszellen vorteilhafterweise durch Affinitätschromatographie gegen Anti- β -Galactosidase-Antikörper identifizieren und isolieren.

Nach Expression und Reinigung der Hybridpeptide oder Polypeptide kann man ihre neuen Teile trennen und isolieren.

Die Erfindung betrifft auch eine Verwendung des oben spezifizierten Verfahrens zur Herstellung eines Impfstoffs; die Anwendung ist dadurch charakterisiert, daß Antikörper gegen das pathogene Mittel isoliert werden, z. B. Antikörper, die nach Injektion des pathogenen Mittels in den Körper eines Tieres, das zur Bildung von Antikörpern gegen dieses Mittel fähig ist, gebildet wurden, und diese Antikörper verwendet werden, um die Klone zu identifizieren, die mindestens ein Protein produzieren, das mindestens ein Epitop besitzt, das einem der Epitope des pathogenen Mittels ähnlich ist, die diesen Klonen entsprechenden Wirtszellen kultiviert werden, um diese Proteine zu produzieren, dieses Protein aus den Klonen der Zellen isoliert und gereinigt wird, und dann dieses Protein zur Herstellung eines Impfstoffs gegen das pathogene Mittel verwendet wird.

Um z. B. einen Anti-HVB-Impfstoff herzustellen, kann man mindestens ein Capsid-Protein des HVB-Virus extrahieren und reinigen, dieses Protein in ein Tier injizieren, das zur Bildung von Antikörpern gegen dieses Protein fähig ist, das mindestens ein Epitop besitzt, das einem der Epitope des HVB-Virus ähnlich ist, dann die Klone der transformierten Wirtszellen, die diesen Klonen entsprechen, in einer Weise kultivieren, um dieses Protein zu produzieren, das Protein aus der Kultur dieser Zellklone isolieren und reinigen, und das Protein zur Herstellung eines Anti-HVB-Impfstoffes verwenden.

Gemäß einer vorteilhaften Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens bestehen die Wirtszellen aus Bakterien wie z. B. *Escherichia coli*, dessen Genom weder das natürliche Gen, das β -Galactosidase exprimiert, noch das EBG-Gen enthält, d. h. Z⁻, EBG⁻-*E. coli*. Die transformierten Zellen werden in dem Medium in Gegenwart von X-gal und dem Indikator IPTG kultiviert, und Zellen, die für β -Galactosidase-Funktionen

positiv sind, werden bestimmt; danach wird für eine Großkultur die transformierende DNA in einen geeigneten Klon von Wirtszellen transplantiert, um mindestens ein Peptid oder Polypeptid zu produzieren.

Die als Kriterium zur Selektion der transformierten Wirtszellen dienende Eigenschaft kann auch die Fähigkeit der durch Kultivierung dieser Klone produzierten Polypeptide oder Proteine sein, an eine bestimmte Verbindung zu binden.

Diese Verbindung kann vorteilhafterweise insbesondere ausgewählt sein unter Peptiden, Polypeptiden oder Proteinen, insbesondere unter Proteinen, die die Transkriptionsaktivität der DNA regulieren.

Auf der anderen Seite kann diese Verbindung auch ausgewählt sein aus DNA- und RNA-Sequenzen.

Gegenstand der Erfindung sind aus solche Proteine, die im Falle erhalten werden, bei dem die als Kriterium zur Selektion der Klone transformierter Wirtszellen dienende Eigenschaft in der Fähigkeit dieser Proteine besteht, an regulative Proteine zu binden, die die Transkriptionsaktivität der DNA kontrollieren, oder an DNA- und RNA-Sequenzen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines Proteins, das in dem ersten speziellen oben beschriebenen Fall erhalten wird, als eine cis-regulative Sequenz, die die Replikation oder Transkription einer benachbarten DNA-Sequenz kontrolliert.

Nachstehend sind Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens sowie einige seiner Anwendungen näher beschrieben.

Zunächst werden insbesondere brauchbare Verfahren beschrieben, um die Synthese von stochastischen Genen durchzuführen, und die Einführung dieser Gene in Bakterien, um Klone transformierter Bakterien zu bilden.

I) Direkte Synthese eines Expressions-Vektors

a) Linearisierung des Vektors

30 µg, das sind ca. 10^{13} Moleküle des pUC8-Expressionsvektors, werden durch Inkubation während 2 Stunden bei 37°C mit 100 Einheiten PstI-Restriktionsenzym in einem Volumen von 300 l des geeigneten Standardpuffers linearisiert. Der linearisierte Vektor wird mit Phenol-Chloroform behandelt, dann in Ethanol ausgefällt, in einem Volumen von 30 l aufgenommen und auf 0,8% Agarose-Gel in Standard TEB-Puffer aufgebracht. Nach Wanderung in einem Feld von 3 V/cm während 3 Stunden wird der linearisierte Vektor elektroverdünn, in Ethanol ausgefällt und in 30 l Wasser aufgenommen.

b) Stochastische Synthese unter Verwendung des Enzyms Terminal Transferase (TdT)

30 µg des linearisierten Vektors werden 2 Stunden lang bei 37°C mit 30 Einheiten TdT in 300 l des geeigneten Puffers in Gegenwart von 1 mM dGTP, 1 mM dCTP, 0,3 mM dTTP und 1 mM dATP reagieren gelassen. Die niedrigere Konzentration von dTTP wird gewählt, um die Häufigkeit von "Stop"-Codons in der entsprechenden Messenger RNA zu verringern. Ein ähnliches Resultat, obgleich etwas ungünstiger, kann erhalten werden durch Verwendung einer niedrigeren Konzentration von dATP als die der anderen Desoxynukleotid-Triphosphate. Der Verlauf der Polymerisation an dem 3'-Ende der PstI-Stellen wird durch Analyse aliquoter

Anteile an einem Gel verfolgt, die während des Verlaufes der Reaktion entnommen werden.

Wenn die Reaktion einen mittleren Wert von 300 Nukleotiden pro 3'-Enden erreicht oder durchläuft, wird die abgebrochen und die freien Nukleotide werden von dem Polymeren durch differenzielle Ausfällung oder durch Leiten über eine Säule, die ein Molekularsieb wie z. B. Biogel P60 enthält, getrennt. Nach Konzentrierung durch Ausfällung in Ethanol werden die Polymeren einer weiteren Polymerisation mit TdT unterworfen, zuerst in Gegenwart von dATP, dann in Gegenwart von dTTP. Diese letzten zwei Reaktionen werden durch eine Filtration an einem Gel getrennt und werden in kurzen Intervallen (30 Sekunden bis 3 Minuten) durchgeführt, um aufeinanderfolgend 10 bis 30 A, gefolgt von 10 bis 30 T den 3'-Enden der Polymeren zuzufügen.

c) Synthese des zweiten Stranges von stochastischer DNA

Jedes Molekül des Vektors besitzt an dem Ende des vorhergehenden Durchlaufes zwei stochastische Sequenzen, dessen 3'-Enden komplementär sind. Die Mischung der Polymeren wird deshalb unter Bedingungen inkubiert, die die Hybridisierung der komplementären Enden begünstigen (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 1 mM EDTA bei 65°C während 10 Minuten, gefolgt von einer Erniedrigung der Temperatur auf 22°C mit einer Geschwindigkeit von 3 bis 4°C pro Stunde). Die hybridisierten Polymeren, werden dann mit 60 Einheiten des großen Fragmentes (Klenow) von Polymerase I in Gegenwart der vier Nukleotid-Triphosphate (200 mM) bei 4°C während 2 Stunden umgesetzt. Diese Stufe bewirkt die Synthese des zweiten Stranges aus den 3'-Enden der Hybrid-Polymeren. Die Moleküle, die aus dieser direkten Synthese, ausgehend vom linearisierten Vektor, resultieren, werden danach verwendet, um kompetente Zellen zu transformieren.

d) Transformierung kompetenter Klone

100 bis 200 ml von kompetentem HB 101 von C 600 werden bei der Konzentration von 10^{10} Zellen/ml mit der stochastischen DNA-Präparation (von oben) in Gegenwart von 6 mM CaCl₂, 6 mM Tris-HCl, pH 8, 6 mM MgCl₂ 30 Minuten bei 0°C inkubiert. Die Mischung wird einem Temperaturschock von 3 Minuten bei 37°C unterworfen, gefolgt von der Zugabe von 400 bis 800 ml NZY-Kulturmedium ohne Antibiotika.

Die transformierte Kultur wird bei 37°C während 16 Minuten inkubiert, dann auf 10 l durch Zugabe von NZY-Medium, das 40 µg/ml Ampicillin enthält, verdünnt. Nach 3 bis 5 Stunden Inkubation bei 37°C wird die verstärkte Kultur zentrifugiert und die Pellets der transformierten Zellen lyophilisiert und bei -70°C aufbewahrt. Eine solche Kultur enthält 3×10^7 bis 10^8 unabhängige Transformanten, wobei jeder ein einziges stochastisches Gen enthält, eingefügt in den Expressionsvektor.

II) Synthese stochastischer Gene, ausgehend von Oligonukleotiden ohne kohäsive Enden

Dieses Verfahren basiert auf der Tatsache, daß die Polymerisation von vernünftig gewählten palindromischen Oligonukleotiden den Aufbau von stochastischen Zellen ermöglicht, die kein "Stop"-Codon in einem der 6 möglichen Leserahmen besitzen, während sie gleichzei-

tig eine ausgeglichene Repräsentation von Triplets, die alle Aminosäuren spezifizieren, sicherstellen. Um eine Wiederholung von Sequenzmotiven in den entstehenden Proteinen zu vermeiden, können die Oligonukleotide weiter eine Zahl von Basen enthalten, die kein vielfaches von 3 ist. Das folgende Beispiel beschreibt die Verwendung einer der möglichen Kombinationen, die diese Kriterien erfüllen:

a) Wahl einer Gruppe von Oktameren

Die Gruppe der folgenden Oligonukleotide:

5' CGAATTCC 3'
 5' CGTCGACC 3'
 5' CAACCTTG 3'
 5' CCATATCG 3'
 5' CATCGATG 3'

setzt sich aus 5 Palindromen (also selbstkomplementären Sequenzen) zusammen, bei denen es leicht ist sicherzustellen, daß ihre stochastische Polymerisation nicht irgendwelche "Stop"-Codons hervorruft, und spezifiziert alle Aminosäuren.

Man kann selbstverständlich andere Gruppen palindromischer Octamerer verwenden, die nicht irgendwelche "Stop"-Codons hervorrufen und alle Aminosäuren spezifizieren, die in Polypeptiden gefunden werden. Es ist selbstverständlich auch möglich, nicht palindromische Gruppen von Octamerer zu verwenden unter der Bedingung, daß ihre Komplemente, die doppelsträngige DNA bilden, auch verwendet werden.

b) Aufbau eines stochastischen Gens aus einer Gruppe von Octamerer

Eine Mischung, die 5 µg jedes der oben angegebenen Oligonukleotide enthält (vorher an der 5'-Stelle durch ein Standardverfahren phosphoryliert) wird in einem Volumen von 100 µl, das 1 mM ATP, 10% Polyethylenglykol und 100 Einheiten T4-DNA-Ligase in dem geeigneten Puffer enthält, bei 13°C während 6 Stunden umgesetzt. Diese Stufe bewirkt die stochastische Polymerisation der Oligomeren im doppelsträngigen Zustand ohne kohäsive Enden. Die entstehenden Polymeren werden durch Laufen lassen über ein Molekularsieb (Biogel P60) isoliert, wobei diejenigen mit 20 bis 100 Oligomeren erhalten werden. Nach Konzentrierung wird diese Fraktion wieder einer Katalyse oder Polymerisation durch T4-DNA-Ligase unter den oben beschriebenen Bedingungen unterworfen. Danach werden, wie oben beschrieben, diejenigen Polymere isoliert, die aus mindestens 100 Oligomeren aufgebaut sind.

c) Herstellung des Wirtsplasmids

Der pUC8-Expressionsvektor wird durch SmaI-Enzym in dem geeigneten Puffer, wie oben beschrieben, linearisiert. Der durch SmaI linearisierte Vektor besitzt keine kohäsiven Enden. Der so linearisierte Vektor wird mit alkalischer Kälbermagenphosphatase (CIP) bei einem Gehalt von einer Einheit pro mg des Vektors in dem geeigneten Puffer bei 37°C 30 Minuten lang behandelt. Das CIP-Enzym wird danach mittels zweier

aufeinanderfolgender Extraktionen mit Phenol-Chloroform inaktiviert. Der linearisierte und dephosphorylierte Vektor wird in Ethanol ausgefällt, dann mit 1 mg/ml in Wasser wieder gelöst.

d) Ligierung des stochastischen Genen an den Vektor

Äquimolare Mengen des Vektors und Polymers werden gemischt und in Gegenwart von 1000 Einheiten T4-DNA-Ligase, 1 mM ATP, 10% Polyethylenglykol in dem geeigneten Puffer 12 Stunden lang bei 13°C inkubiert. Diese Stufe ligiert die stochastischen Polymeren in den Expressionsvektor und bildet doppelsträngige, kreisförmige Moleküle, die deshalb zur Transformation geeignet sind.

Transformation kompetenter Klone

Die Transformation kompetenter Klone wird in der vorstehend beschriebenen Weise durchgeführt.

III) Aufbau stochastischer Gene, ausgehend von einer Gruppe von Heptameren

Dieses Verfahren unterscheidet sich von dem gerade beschriebenen dadurch, daß man palindrome Heptamere verwendet, die variable kohäsive Enden besitzen, anstelle der stochastischen Sequenzen, die eine geringere Anzahl identischer Motive enthalten.

a) Wahl einer Gruppe von Heptameren

Es ist zum Beispiel möglich, die folgenden drei palindromischen Heptameren zu verwenden:

5' XTCCCGA 3'
 5' XCTCCAG 3'
 5' RCGTACC 3'

worin X = A, G, C, oder T oder R = A oder T, und worin die Polymerisation nicht irgendwelche "Stop"-Codons bilden kann und Triplets bildet, die alle Aminosäuren spezifizieren.

Es ist selbstverständlich möglich, andere Gruppen von Heptameren zu verwenden, die diese gleichen Bedingungen erfüllen.

b) Polymerisation einer Gruppe von Heptameren

Diese Polymerisation wird in genau dergleichen Weise durchgeführt, wie sie oben für Octamere beschrieben ist.

c) Eliminierung kohäsiver Enden

Die so erhaltenen Polymeren haben an ihren zwei 5'-Enden eine ungepaarte Base. Es ist deshalb notwendig, die komplementäre Base an den entsprechenden 3'-Enden anzufügen. Dies wird wie folgt ausgeführt: 10 µg der doppelsträngigen Polymeren werden mit 10 Einheiten des Klenow-Enzyms in Gegenwart der 4-Deoxynukleotid-phosphate (200 mM) in einem Volumen von 100 µl bei 4°C während 60 Minuten umgesetzt. Das Enzym wird durch Phenol-Chloroform-Extraktion inaktiviert und die Polymeren werden von den verbliebenen freien Nukleotiden durch differentielle Ausfällung ge-

reingt. Die Polymeren werden dann an das Wirtsplasmid (vorher linearisiert und dephosphoryliert) gemäß dem oben beschriebenen Verfahren ligiert.

Es ist festzustellen, daß die zwei letztbeschriebenen Verfahren palindromische Octamere oder Heptamere verbinden, die spezifische Stellen von gewissen Restriktionsenzymen bilden. Diese Stellen fehlen zum größten Teil im pUC8-Expressionsvektor. Es ist deshalb möglich, die Komplexität einer anfänglichen Präparation von stochastischen Genen beträchtlich zu vermehren, wenn man nach dem folgenden Weg vorgeht: Die Plasmid-DNA, die sich von der Kultur von 10^7 unabhängigen Transformanten, die nach einer der beiden letzten oben beschriebenen Verfahren erhalten wurde, ableitet, wird isoliert. Nachdem diese DNA gereinigt ist, wird sie teilweise von ClaI-Restriktionsenzym (Verfahren II) oder von PstI-Restriktionsenzym (Verfahren III) verdaut. Nach Inaktivierung des Enzyms wird die teilweise verdaut DNA mit T4-DNA-Ligase behandelt, die die Wirkung hat, eine sehr große Zahl neuer Sequenzen hervorzurufen, während die fundamentalen Eigenschaften der anfänglichen Sequenzen bewahrt bleiben. Dieses neue Ensemble stochastischer Sequenzen kann dann verwendet werden, um kompetente Zellen zu transformieren. Zusätzlich können die nach dem Verfahren II und III klonierten stochastischen Gene in inaktiver Form aus dem pUC8-Expressionsvektor unter Verwendung von Restriktionsstellen herausgeschnitten werden, die zu dem klonierenden Vektor gehören und in den stochastischen DNA-Sequenzen nicht vorhanden sind.

Die Rekombinierung innerhalb der durch die zwei gerade beschriebenen Verfahren gebildeten stochastischen Gene, die aus der internen Homologie aufgrund der wiederkehrenden molekularen Motive resultieren, ist eine wichtige zusätzliche Methode, um in vivo Mutagenese der kodierenden Sequenzen zu erreichen. Dies ergibt eine Vermehrung der Zahl neuer Gene, die geprüft werden können.

Schließlich ist es für alle Verfahren zur Schaffung neuer synthetischer Gene möglich, eine Zahl allgemein üblicher Verfahrensweisen zu verwenden, um Gene in vivo oder in vitro zu modifizieren, wie z. B. eine Änderung des Leserahmens, Inversion von Sequenzen im Hinblick auf ihren Promotor, Punktmutationen oder Verwendung von Wirtszellen, die eine oder mehrere Suppressor-tRNAs exprimieren.

Unter Berücksichtigung der obigen Beschreibung ist es klar, daß es möglich ist, in vitro eine extrem große Zahl (z. B. mehr als eine Milliarde) verschiedener Gene durch enzymatische Polymerisation von Nukleotiden oder Oligonukleotiden zu konstruieren. Diese Polymerisation wird in einer stochastischen Weise durchgeführt, wie sie bestimmt wird durch die jeweiligen Konzentrationen der Nukleotide oder Oligonukleotide, die in der Reaktionsmischung vorhanden sind.

Wie vorstehend gezeigt, können zwei Verfahren verwendet werden, um solche Gene (oder kodierende Sequenzen) zu klonieren: die Polymerisation kann direkt an einem klonierenden Expressionsvektor durchgeführt werden, der vorher linearisiert wurde; oder es ist möglich, auf die Polymerisation dann die Ligierung der Polymeren auf dem Expressionsvektor folgen zu lassen.

In den zwei Fällen ist die nächste Stufe die Transformation oder Transfektion kompetenter Bakterienzellen (oder Zellen in Kultur). Diese Stufe umfaßt die Klonierung der stochastischen Gene in lebenden Zellen, wo sie unbegrenzt vermehrt und exprimiert werden.

Es ist klar, daß es zusätzlich zu den vorstehend be-

schriebenen Verfahren möglich ist, alle anderen Verfahren zu verwenden, die zur Synthese stochastischer Sequenzen geeignet sind. Insbesondere ist es möglich, die Polymerisation von einzelsträngigen Oligomeren der DNA oder RNA, erhalten durch chemische Synthese, durch biochemische Mittel durchzuführen, dann diese Segmente von DNA oder RNA nach bewährten Verfahren zu behandeln, um doppelsträngige DNA (cDNA) auszubilden, um solche Gene zu klonieren.

Screening oder Selektion von Klonen transformierter Wirtszellen

Die weitere Stufe des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht in der Prüfung der transformierten oder transfektierten Zellen durch Selektion oder Screening, um eine oder mehrere Zellen zu isolieren, deren transformierende oder transfektierende DNA zur Synthese eines Transkriptionsproduktes (RNA) oder Translationsproduktes (Peptid, Polypeptid oder Protein) führt, das die gewünschte Eigenschaft besitzt. Diese Eigenschaften können z. B. enzymatischer, funktioneller oder struktureller Natur sein.

Einer der wichtigsten Aspekte des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht in dem gleichzeitigen Screening oder Selektion des verwertbaren Produktes (Peptid, Polypeptid oder Protein) und des Gens, welches dieses Produkt produziert. Zusätzlich kann die, wie beschrieben, synthetisierte und klonierte DNA selektiert oder gescreent werden, um DNA-Sequenzen zu isolieren, die selbst Produkte bilden, die verwertbare biochemische Eigenschaften besitzen.

Es werden nun, als nicht einschränkende Beispiele, bevorzugte Verfahren zum Screening oder zur Selektion von Klonen transformierter Zellen beschrieben, die solcher Art sind, daß die neuen Proteine vom Standpunkt industrieller oder medizinischer Anwendungen von Interesse sind.

Eines dieser Verfahren beruht auf der Idee der Herstellung oder des Erhaltens polyklonaler oder monoklonaler Antikörper durch bewährte Techniken, die gegen ein Protein oder einen anderen Typ eines Moleküls von biochemischem oder medizinischem Interesse gerichtet sind, wobei dieses Molekül immunisierend ist oder gemacht wurde und nachfolgende Verwendung dieser Antikörper als Proben, um unter der sehr großen Zahl von Klonen, die durch stochastische Gene transformiert wurden, diese zu identifizieren, dessen Protein mit diesen Antikörpern reagiert. Diese Reaktion ist ein Ergebnis einer strukturellen Homologie, die zwischen dem durch die stochastischen Gene synthetisierten Polypeptid und dem anfänglichen Molekül besteht. Es ist auf diese Weise möglich, zahlreiche neue Proteine zu isolieren, die als epitope oder antigene Determinanten auf dem anfänglichen Molekül wirken. Solche neuen Proteine neigen dazu, die Wirkung des anfänglichen Moleküls zu simulieren, stimulieren, modulieren oder zu blockieren. Es ist verständlich, daß dieses Mittel von Selektion oder Screening selbst sehr viele pharmakologische und biochemische Anwendungen haben kann. Nachfolgend beschreiben wir als nicht einschränkendes Beispiel diese erste Verfahrensart in einem konkreten Fall:

EGF (epidermal growth factor) ist ein kleines Protein, das im Blut vorhanden ist, dessen Rolle es ist, das Wachstum von Epithelzellen zu stimulieren. Diese Wirkung wird durch die Wechselwirkung von EGF mit einem spezifischen Rezeptor erhalten, der sich in der Membran der Epithelzellen befindet.

Gegen EGF gerichtete Antikörper werden hergestellt, indem man mit an KLH (keyhole limpet hemocyanin) gekuppeltes EGF in Tiere injiziert, um die Immunität des EGF zu erhöhen. Die Anti-EGF-Antikörper der immunisierten Tiere werden gereinigt, z. B. durch Leiten über eine Affinitätsäule, worin der Ligand EGF oder ein synthetisches Peptid, das einem Fragment von EGF entspricht, ist. Diese gereinigten Anti-EGF-Antikörper werden an einem festen Träger als Proben verwendet, um eine große Zahl von durch Chloroform gelysten Bakterienklone zu screenen. Die Anti-EGF-Antikörper binden solche stochastische Peptide oder Proteine, deren Epitope denen des anfänglichen Antigens gleichen. Die solche Peptide oder Proteine enthaltenden Klone werden durch Autoradiographie nach Inkubation des festen Trägers mit radioaktivem Protein A, oder nach Inkubation mit einem radioaktiven Anti-Antikörper-Antikörper sichtbar gemacht.

Diese Stufen identifizieren solche Klone, von denen jedes ein Protein (und sein Gen) enthält, das mit dem screenenden Antikörper reagiert. Es ist möglich, unter einer sehr großen Zahl von Bakteriellenzellen-Kolonien oder viralen Plaques (z. B. in der Größenordnung von einer Million) zu screenen und es ist möglich, extrem kleinen Mengen des Proteinprodukts, in der Größenordnung von 1 ng, festzustellen. Danach werden die identifizierten Klone kultiviert und die so bestimmten Proteine werden auf konventionellen Wegen gereinigt. Diese Proteine werden in vitro in Epithelzellen-Kulturen getestet, um zu bestimmen, ob sie die Wirkungen von EGF auf diese Kulturen inhibieren, simulieren oder modulieren. Unter den so erhaltenen Proteinen können einige für die chemotherapeutische Behandlung von Hautkrebs verwendet werden. Die Wirkungen der so erhaltenen Proteine können durch Mutation der für die Proteine kodierenden DNA verbessert werden auf Wegen, die denen der oben beschriebenen analog sind. Eine Variante dieses Verfahrens besteht in der Reinigung dieser stochastischen Peptide, Polypeptide oder Proteine, die als Impfstoffe verwendet werden können, oder allgemeiner dazu, eine Immunität gegen ein pathogenes Mittel zu übertragen und andere Wirkungen auf das immunologische System auszuüben, z. B. um im Hinblick auf ein bestimmtes Antigen eine Toleranz zu schaffen oder die Überempfindlichkeit zu verringern, insbesondere aufgrund der Bindung dieser Peptide, Polypeptide oder Proteine mit den gegen dieses Antigen gerichteten Antikörpern. Es ist klar, daß es möglich ist, solche Peptide, Polypeptide oder Proteine in vitro sowie in vivo zu verwenden.

Genauer ausgedrückt hat in dem Ensemble neuer Proteine, die mit den Antikörpern gegen ein bestimmtes Antigen X reagieren, jedes mindestens ein Epitop zusammen mit X, so daß das Ensemble ein Ensemble von Epitopen zusammen mit X besitzt. Dies erlaubt die Verwendung des Ensembles oder Sub-Ensembles als Impfstoff, um Immunität gegen X zu übertragen. Es ist z. B. einfach, ein oder mehrere der Capsid-Proteine des Hepatitis B Virus zu reinigen. Diese Proteine können dann in ein Tier injiziert werden, z. B. ein Kaninchen, und die dem anfänglichen ursprünglichen Antigen entsprechenden Antikörper können durch Affinitätsäulen-Reinigung gewonnen werden. Diese Antikörper können, wie oben beschrieben, verwendet werden, um Klone zu identifizieren, die mindestens ein Protein produzieren, das ein Epitop besitzt, das mindestens einem der Epitope des ursprünglichen Antigens ähnelt. Nach Reinigung werden diese Proteine als Antigene verwendet (entwe-

der allein oder in Kombination), mit dem Ziel, Schutz gegen Hepatitis B zu übertragen. Die endgültige Herstellung des Impfstoffes erfordert keinen weiteren Einsatz des ursprünglichen pathogenen Mittels.

Es wird darauf hingewiesen, daß vorstehend mehrere Methoden beschrieben wurden, um eine Selektion oder ein Screening zu erreichen. Alle diese Methoden können die Reinigung eines bestimmten Proteins von einem transformierten Klon erfordern. Diese Proteinreinigungen können durch bewährte Verfahren durchgeführt werden und verwenden insbesondere die Techniken der Gelchromatographie, Ionenaustausch und Affinitätschromatographie. Zusätzlich können die durch stochastische Gene erzeugten Proteine in Form von Hybridproteinen kloniert gewesen sein, z. B. mit einer Sequenz des β -Galactosidase-Enzyms, welche Affinitätschromatographie gegen Anti- β -Galactosidase-Antikörper und die nachfolgende Abspaltung des Hybridteils erlaubt (d. h. die Trennung des neuen Teils und des bakteriellen Teils von dem Hybridprotein). Nachfolgend werden die Prinzipien und das Verfahren zur Selektion von Peptiden, Polypeptiden oder Proteinen und der entsprechenden Gene gemäß einem zweiten Verfahren des Screenings und der Selektion beschrieben, das auf der Bestimmung der Fähigkeit dieser Peptide oder Polypeptide beruht, eine spezifische Reaktion zu katalysieren.

Als ein konkretes und nicht einschränkendes Beispiel wird das Screening oder die Selektion in dem besondern Fall eines Proteins beschrieben, das fähig ist, die Spaltung von Lactose zu katalysieren, eine Funktion, die normalerweise von dem Enzym β -Galactosidase (β -gal) erfüllt wird.

Wie vorstehend beschrieben, besteht die erste Stufe des Verfahrens in der Schaffung eines sehr großen Ensembles von Expressionsvektoren, von denen jeder ein bestimmtes neues Protein exprimiert. Im konkreten Fall kann man z. B. einen pUC8-Expressionsvektor wählen, mit klonierten stochastischen Sequenzen von DNA in der PstI-Restriktionsstelle. Die so erhaltenen Plasmide werden dann in ein Klon von *E. coli* eingebracht, von dessen Genom das natürliche Gen für β -Galactosidase Z, und ein zweites Gen EBG, das zum ersten in keiner Beziehung steht aber dazu fähig ist, in Richtung β -gal-Funktion zu mutieren, beide durch bekannte genetische Methoden entfernt wurden. Solche Wirtszellen (Z⁻, EBG⁻) sind für sich nicht fähig, die Lactose-Hydrolyse zu katalysieren und als Konsequenz Lactose als Kohlenstoffquelle für das Wachstum zu verwenden. Dies erlaubt die Verwendung solcher Wirtsklone für das Screening oder die Selektion für β -gal-Funktion.

Eine zweckmäßige biologische Prüfung zur Analyse transformierter *E. coli* Klone auf solche, die neue Gene, die eine β -gal-Funktion exprimieren, besteht in der Kultur von wie beschrieben transformierten Bakterien in Petrischalen, die X-gal in dem Medium enthalten. In diesem Fall werden alle Bakterienkolonien, die eine β -gal-Funktion exprimieren, als blaue Kolonien sichtbar gemacht. Unter Verwendung einer solchen biologischen Prüfung ist es möglich, sogar schwache katalytische Aktivität festzustellen. Die spezifische Aktivität von charakteristischen Enzymen liegt im Bereich von 10 bis 10 000 Produktmolekülen pro Stunde.

Unter der Annahme, daß durch ein stochastisches Gen synthetisiertes Protein eine schwache spezifische Aktivität besitzt in der Größenordnung von einem Molekül pro 100 Sekunden, bleibt es möglich, eine solche katalytische Aktivität zu bestimmen. In einer Petrischale, die im Medium X-gal enthält und in Gegenwart des

nicht metabolisierbaren Inducer IPTG (Isopropyl-D-thiogalactosid) erfordert die Sichtbarmachung einer blauen Region die Spaltung von ca. 10^{10} bis 10^{11} Molekülen an X-gal pro mm^2 . Eine Bakterienkolonie, die ein schwaches Enzym exprimiert und eine Oberfläche von 1 mm^2 einnimmt, hat ca. 10^7 bis 10^8 Zellen. Wenn jede Zelle nur eine Kopie des schwachen Enzyms besitzt, würde jede Zelle zur Katalyse der Spaltung zwischen 10 000 und 100 von X-gal benötigen, um bestimmt zu werden, was zwischen 2,7 und 270 Stunden erfordert würde. Da es unter selektiven Bedingungen möglich ist, die Zahl der Kopien jedes Plasmids pro Zelle auf 5 bis 20 Kopien pro Zelle zu verstärken oder sogar auf 100 oder 1000 und weil bis zu 10% des Proteins der Zelle durch das neue Gen spezifiziert werden kann, ist die zur Bestimmung einer blauen Kolonie im Fall von 100 Enzymmolekülen schwacher Aktivität pro Zelle benötigte Zeit in der Größenordnung von 0,27 bis 2,7 Stunden.

Als Konsequenz dieser Tatsachen ist das Screening einer sehr großen Zahl unabhängiger Bakterienkolonien, von denen jede ein verschiedenes neues Gen exprimiert und die Verwendung der Fähigkeit, eine β -gal-Funktion zu exprimieren, als Selektionskriterium voll möglich. Es ist möglich, das Screening von ca. 2000 Kolonien in einer Petrischale von 10 cm Durchmesser durchzuführen. So können ca. 20 Millionen Kolonien auf einem Blatt von X-gal-Agar von 1 m^2 gescreent werden.

Es ist festzustellen, daß Bakterienkolonien, die auf X-gal-Petrischalen blau erscheinen, falsche Positive sein können, und zwar aufgrund einer Mutation in dem Bakteriengenom, durch die sie die Fähigkeit erhalten, Lactose zu metabolisieren, oder aus anderen Gründen als denen, die aus einer katalytischen Wirkung des neuen, durch die Zellen der Kolonie exprimierten Proteins resultieren. Solche falschen Positive können durch Reinigung der DNA des Expressionsvektors von der positiven Kolonie und Retransformation von Z^- , EBG $^-$ -E. coli-Wirtszellen direkt eliminiert werden. Wenn die β -gal-Aktivität auf dem durch das neue Gen in dem Expressionsvektor kodierte Protein beruht, werden alle durch diesen Vektor transformierten Zellen β -gal-Funktion zeigen. Im Gegensatz dazu ist es eine seltene Erscheinung und unabhängig von der Transformation, wenn die ursprüngliche blaue Kolonie auf einer Mutation im Genom der Wirtszelle beruht, und deshalb wird die Zahl der Zellen des neuen Klon von transformiertem E. coli, die zur Expressierung der β -gal-Funktion fähig sind, klein oder 0 sein.

Die Leistung der gleichzeitigen Massenreinigung aller Expressionsvektoren aller positiven Klone (blau), gefolgt von Retransformation naiver Bakterien sollte hervorgehoben werden. Unter der Annahme, daß es das Ziel ist, ein Screening durchzuführen, um Proteine zu selektieren, die eine katalytische Funktion besitzen und daß die Wahrscheinlichkeit, daß ein neues Peptid oder Polypeptid diese Funktion mindestens wöchentlich ausführt, 10^{-6} ist, während die Wahrscheinlichkeit, daß ein Klon des bakteriellen E. coli-Wirts einer Mutation unterliegt, die ihn dazu befähigt, die gleiche Funktion auszuüben, 10^{-5} ist, dann errechnet werden, daß unter 20 Millionen transformierten Bakterien, die gescreent werden, 20 positive Klone den neuen Genen in den Expressionsvektoren, welche jeweils eines tragen, zuzuschreiben sind, während 200 positive Klone das Ergebnis einer Genom-Mutation sein werden. Die Massenreinigung der Expressionsvektoren von den insgesamt 220 positiven bakteriellen Klonen, gefolgt von der Retransformation naiver Bakterien mit der Mischung dieser Expressionsvektoren

wird eine große Zahl positiver Klone produzieren, die aus allen diesen Bakterien bestehen, die mit den 20 Expressionsvektoren transformiert sind, die für die neuen Proteine kodieren, die die gewünschte Funktion besitzen und eine sehr kleine Zahl von bakteriellen Klonen, die aus genomischen Mutationen resultieren und die 200 Expressionsvektoren enthalten, die nicht von Interesse sind. Eine kleine Zahl von Reinigungszyklen von Expressionsvektoren von positiven bakteriellen Kolonien, gefolgt von einer solchen Retransformation, erlaubt die wirklich positive Bestimmung sehr seltener Expressionsvektoren für eine gewünschte katalytische Aktivität, trotz einer hohen Hintergrundrate von Mutationen in den Wirtszellen für die gleiche Funktion.

Nachfolgend auf die Screening-Verfahren dieser Art ist es möglich, das neue Protein durch bewährte Techniken zu reinigen. Die Herstellung dieser Proteine in großer Menge wird durch die Tatsache möglich gemacht, daß die Identifizierung des brauchbaren Proteins zusammen mit der gleichzeitigen Identifizierung des Gens stattfindet, das für das gleiche Protein kodiert. Es kann deshalb entweder der gleiche Expressionsvektor verwendet werden oder das neue Gen kann für seine Synthese und Isolierung in großer Menge in einen geeigneten Expressionsvektor transplantiert werden.

Es ist möglich, dieses Screeningverfahren für irgendeine enzymatische Funktion anzuwenden, für die eine geeignete biologische Prüfung existiert. Für solche Screenings ist es nicht notwendig, daß die enzymatische Funktion, die gesucht wird, für die Wirtszelle brauchbar ist. Es ist möglich, die Screenings nicht nur für eine enzymatische Funktion auszuführen, sondern für irgendeine andere gewünschte Eigenschaft, für die es möglich ist, eine geeignete biologische Prüfung zu schaffen. Es ist deshalb selbst in dem einfachen Fall einer β -gal-Funktion, die an einer X-gal-Petriplatte sichtbar gemacht wird möglich, ein Screening in der Größenordnung von 100 Millionen oder sogar einer Milliarde neuer Gene für eine katalytische Aktivität oder irgendeine andere gewünschte Eigenschaft durchzuführen.

Selektion transformierter Wirtszellen

Auf der anderen Seite ist es möglich, die Selektionstechniken für irgendeine Eigenschaft, katalytischer oder anderer Natur, zu verwenden, worin die Gegenwart oder Abwesenheit der Eigenschaft für das Überleben der Wirtszellen, die die Expressionsvektoren enthalten, die für die neuen Gene kodieren, wesentlich ist oder auch verwendet werden kann, um die Viren zu selektieren, die das gewünschte neue Gen kodieren und exprimieren. Als nicht eingeschränktes, aber konkretes Beispiel soll die Selektion der β -Galactosidase-Funktion beschrieben werden. Ein geeignetes Klon von Z^- EBG $^-$ -E. coli ist nicht fähig, auf Lactose als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Es ist deshalb nach Durchführung der ersten oben beschriebenen Stufe möglich, eine sehr große Zahl von Wirtszellen, die durch Expressionsvektoren transformiert sind, die für die neuen Gene kodieren, unter selektiven Bedingungen zu kultivieren, entweder durch progressive Verringerung anderer Kohlenstoffquellen oder alleiniger Verwendung von Lactose vom Start an. Während der Durchführung einer solchen Selektion erlaubt die in vivo Mutagenese durch Rekombination oder durch explizite Gewinnung der Expressionsvektoren und Mutagenese ihrer neuen Ge-

ne in vitro durch verschiedene Mutagene oder durch irgendeine andere übliche Technik, anpassungsfähige Verbesserungen in der Fähigkeit, die gewünschte katalytische Funktion zu erfüllen. Wenn zur gleichen Zeit Selektionstechniken und zweckmäßige Bioassay-Techniken existieren, wie im vorliegenden Fall, ist es möglich, die Selektionstechniken anfangs zu verwenden, um die Repräsentation der Wirtsbakterien, die die β -gal-Funktion exprimieren, anzureichern und dann ein Screening auf einer Petriplatte an X-gal-Medium durchzuführen, um wirkungsvoll zu bestimmen, welches die positiven Zellen sind. In Abwesenheit zweckmäßiger Bioassays ist die Anwendung einer progressiv genaueren Selektion der einfachste Weg, um ein oder eine kleine Zahl bestimmter Wirtszellen zu reinigen, deren Expressionsvektoren für die Proteine kodieren, die die gewünschte Reaktion katalysieren.

Es ist möglich, diese Techniken zu verwenden, um neue Proteine zu finden, die eine große Vielzahl struktureller und funktioneller Charakteristika neben der Fähigkeit, eine spezifische Reaktion zu katalysieren, besitzen. Zum Beispiel ist es möglich, ein Screening oder Selektion für neue Proteine durchzuführen, die an cis-regulative Stellen an der DNA binden, und dabei die Expression einer der Wirtszellen-Funktionen blockieren oder die Transkription der DNA blockieren, die Transkription stimulieren usw.

Im Falle von *E. coli* exprimiert z. B. ein Klonmutant in dem Repressor des Lactose-Operons (*i*-) grundlegend die β -gal-Funktion aufgrund der Tatsache, daß der Lactose-Operator nicht reprimiert ist. Alle Zellen dieses Typs produzieren auf Petriplatten, die X-gal-Medium enthalten, blaue Klone. Es ist möglich, solche Wirtszellen mit Expressionsvektoren zu transformieren, die neue Proteine synthetisieren und ein Screening mit X-gal-Petriplatten durchzuführen, um die Klone zu bestimmen, die nicht blau sind. Unter diesen repräsentieren einige den Fall, bei dem das neue Protein an den Lactose-Operator bindet und die Synthese von β -gal unterdrückt (reprimiert). Es ist dann möglich, solche Plasmide in Masse zu isolieren, zu retransformieren und solche Klone, die kein β -gal produzieren, zu isolieren und danach eine detaillierte Prüfung durchzuführen.

Selektion von Proteinen, die zur Katalyse einer Folge von Reaktionen fähig sind

Nachfolgend beschreiben wir ein weiteres Mittel der Selektion, das unabhängige Anwendungen eröffnet, die auf dem Prinzip der gleichzeitigen und parallelen Selektion einer bestimmten Zahl von neuen Proteinen beruhen, die dazu fähig sind, eine verbundene Sequenz von Reaktionen zu katalysieren.

Die Basisidee dieses Verfahrens ist die folgende: Es wird ein anfängliches, ursprüngliches Ensemble von chemischen Verbindungen als Aufbaublöcke oder Konstruktionselemente angenommen, von denen man erhofft, daß sie eine oder mehrere gewünschte chemische Verbindungen mittels einer katalysierten Sequenz von chemischen Reaktionen synthetisieren, wobei eine sehr große Zahl von Reaktionswegen existiert, die teilweise oder vollständig für einen anderen ausgetauscht werden können, die alle thermodynamisch möglich sind und die von dem Satz von Aufbaublöcken zu der gewünschten Zielverbindung (Zielverbindungen) führen. Eine wirksame Synthese einer Zielverbindung wird begünstigt, wenn jede Stufe von mindestens einem Reaktionsweg, der von den Verbindungen des Aufbaublocks zu der

Zielverbindung führt, aus Reaktionen besteht, von denen jede katalysiert wird. Auf der anderen Seite ist es relativ unwichtig, welcher der vielen unabhängigen oder teilweise unabhängigen Reaktionswege katalysiert wird. In der vorstehenden Beschreibung haben wir gezeigt, wie es möglich ist, eine sehr große Zahl von Wirtszellen zu erhalten, von denen jede ein bestimmtes neues Protein exprimiert.

Jedes dieser neuen Proteine kommt in Frage, um eine oder die andere der möglichen Reaktionen in dem Satz aller möglichen Reaktionen zu katalysieren, die von dem Ensemble der Aufbaublöcke zu der Zielverbindung führen. Wenn eine ausreichend große Zahl stochastischer Proteine in einer Reaktionsmischung vorhanden ist, die die Aufbaublock-Verbindungen enthält, so daß eine ausreichend große Zahl der möglichen Reaktionen katalysiert wird, ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, daß eine verbundene Sequenz von Reaktionen, die von dem Satz der Aufbaublock-Verbindungen zu der Zielverbindung führen, durch ein Subsortiment der neuen Proteine katalysiert wird. Es ist klar, daß dieses Verfahren auf die Katalyse von nicht nur einer, sondern mehrerer Zielverbindungen gleichzeitig ausgedehnt werden kann.

Auf diesem Prinzip basierend ist es möglich, wie nachfolgend angegeben zu verfahren, um parallel einen Satz neuer Proteine zu selektieren, die eine gewünschte Sequenz von chemischen Reaktionen katalysieren:

1. Es wird der gewünschte Satz von Verbindungen spezifiziert, der die Aufbaublöcke bildet, wobei vorzugsweise eine angemessene große Zahl bestimmter chemischer Spezies verwendet wird, um die Zahl potentieller gleichzeitiger Reaktionen, die zu der gewünschten Zielverbindung führen, zu erhöhen.

2. Es wird ein geeignetes Volumen an Reaktionsmedium verwendet, dazu eine sehr große Zahl neuer stochastischer Proteine zugefügt, die aus transformierten oder transfektierten Zellen, die diese Proteine synthetisieren, isoliert wurden. Es wird ein Versuch ausgeführt, um zu bestimmen, ob die Zielverbindung gebildet wird. Wenn dies der Fall ist, wird sichergestellt, daß diese Bildung die Gegenwart der Mischung der neuen Proteine erfordert. Wenn dies so ist, sollte die Mischung dann ein Subsortiment von Proteinen enthalten, die eine oder mehrere Reaktionswege, die von dem Satz des Aufbaublocks zu der Zielverbindung führen, katalysieren. Das anfängliche Ensemble von Klonen, die den Satz der neuen stochastischen Proteine, das Subsortiment, das erforderlich ist, um die Sequenz von Reaktionen, die zu der Zielverbindung führen, zu katalysieren, ist zu reinigen und zu teilen.

Genauer beschreiben wir nachfolgend als nicht einschränkendes Beispiel die Selektion neuer Proteine, die dazu fähig sind, die Synthese eines spezifischen kleinen Peptids, insbesondere eines Pentapeptids, ausgehend von einem Aufbaublock, der aus kleineren Peptiden und Aminosäuren besteht, zu katalysieren. Alle Peptide setzen sich aus einer linearen Sequenz von 20 verschiedenen Aminosäure-Arten zusammen und sind von dem Amino- zum Carboxy-Ende orientiert. Durch Endkondensation zweier kleinerer Peptide (oder von zwei Aminosäuren) oder durch Hydrolyse eines größeren Peptids kann irgendein Peptid in einer einzigen Stufe gebildet werden. Ein Peptid mit M-Resten kann so gebildet wer-

den durch M-1-Kondensationsreaktionen. Die Zahl von Reaktionen, R, durch welche ein Satz von Peptiden mit der Länge 1, 2, 3, ... M Resten ineinander übergeführt werden kann, ist größer als die Zahl von möglichen molekularen Spezies (T). Dies kann ausgedrückt werden als $R/T = M - 2$. Ausgehend von einem bestimmten Ensemble von Peptiden kann so eine sehr große Zahl von unabhängigen oder teilweise unabhängigen Reaktionswegen zur Synthese eines spezifischen Zielpeptids führen. Es ist ein Peptapeptid auszuwählen, dessen Gegenwart leicht durch einige übliche Untersuchungsmethoden, wie z. B. HPLC (Flüssigphasen-Hochdruckchromatographie), Papierchromatographie usw. bestimmt werden kann. Die Bildung einer Peptidbindung erfordert in einem verdünnten wäßrigen Medium Energie, aber wenn die Peptide, die an den Kondensationsreaktionen teilnehmen, angemessen konzentriert werden, ist die Bildung der Peptidbindungen thermodynamisch gegenüber der Hydrolyse begünstigt und tritt in Gegenwart eines geeigneten enzymatischen Katalysators, z. B. Pepsin oder Trysin, wirkungsvoll in Erscheinung, ohne die Gegenwart von ATP oder anderen Verbindungen mit hoher Energie zu erfordern. Eine solche Reaktionsmischung von kleinen Peptiden, deren Aminosäuren radioaktiv markiert sind, um als Tracer mit ^3H , ^{14}C , ^{35}S zu wirken und den Aufbaublocksatz darstellt, kann in ausreichend hohen Konzentrationen verwendet werden, um zu Kondensationsreaktionen zu führen.

Es ist z. B. möglich, wie folgt zu verfahren: 15 mg jeder der Aminosäuren und kleinen Peptide mit 2 bis 4 Aminosäuren, die zum Aufbau des Aufbaublocksatzes ausgewählt wurden, werden in einem Volumen von 0,25 ml bis 1,0 ml eines 0,1 M Phosphatpuffers (pH = 7,6) gelöst. Eine große Zahl von wie vorstehend beschrieben, gebildeten und isolierten neuen Proteinen wird von ihren bakteriellen oder anderen Wirtszellen gereinigt. Die Mischung dieser neuen Proteine wird auf eine Endkonzentration in der Größenordnung von 0,8 bis 1,0 mg/ml in dem gleichen Puffer gelöst. 0,25 ml bis 0,5 ml der Proteinmischung werden zu der Mischung der Aufbaublocke gegeben. Diese wird bei 25°C bis 40°C 1 bis 40 Stunden lang inkubiert. Aliquote Teile von 8 µl werden in regelmäßigen Intervallen entnommen, der erste als "Blindprobe" verwendet und vor der Zugabe der Mischung der neuen Proteine genommen. Diese aliquoten Anteile werden durch Chromatographie unter Verwendung von n-Butanol-Essigsäure-Pyridin-Wasser (30:6:20:24, als Volumen) als Lösungsmittel analysiert. Das Chromatogramm wird getrocknet und mittels Ninhydrin oder Autoradiographie (mit oder ohne intensivierende Filter) analysiert. Weil die den Aufbaublocksatz bildende Verbindung radioaktiv markiert ist, wird die Zielverbindung radioaktiv sein und eine spezifische Aktivität haben, die hoch genug ist, um eine Bestimmung bei einem Gehalt von 1 bis 10 ng zu ermöglichen. Anstelle einer Standard-chromatographischen Analyse ist es möglich, HPLC (Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie) zu verwenden, die schneller und einfacher durchzuführen ist. Im allgemeinen können alle üblichen analytischen Verfahren verwendet werden. Es ist deshalb möglich, eine Ausbeute an der Zielverbindung von weniger als ein Teil pro Million Gewichtsteile, bezogen auf die Verbindungen, die als anfängliche Aufbaublocke verwendet wurden, zu bestimmen.

Wenn unter den oben beschriebenen Bedingungen ein Peptapeptid gebildet wird, aber nicht wenn ein Extrakt verwendet wird, der sich durch einen Expressionsvektor, der keine stochastischen Gene enthält, transfor-

mierten Wirtszellen ableitet, ist die Bildung des Peptapeptids nicht als Ergebnis bakterieller Verunreinigungen und erfordert so die Gegenwart einer Subkollektion (Teilmenge) der neuen Proteine in der Reaktionsmischung.

Die folgende Verfahrensstufe besteht in der Abtrennung der besonderen Teilmenge von Zellen, die Expressionsvektoren mit den neuen Proteinen enthalten, die die Folge von Reaktionen, die zu dem Ziel Pentapeptid führt, katalysieren. Wenn z. B. die Zahl der Reaktionen, die diese Sequenz bilden 5 ist, gibt es ca. 5 neue Proteine, die die notwendigen Reaktionen katalysieren. Wenn die Klonbank von Bakterien, die die Expressionsvektoren enthalten, die für die neuen Gene kodieren, eine Zahl von bestimmten neuen Genen besitzt, die in der Größenordnung von einer Million ist, werden alle diese Expressionsvektoren insgesamt isoliert und in 100 unterschiedliche Kollektionen von 10^8 Bakterien retransformiert, bei einem Verhältnis von Vektoren zu Bakterien, das ausreichend niedrig ist, das im Durchschnitt die Zahl der Bakterien in jeder Kollektion, die transformiert wird, ca. die Hälfte der Zahl der ursprünglichen Gene ist, d. h. ca. 500 000. Die Wahrscheinlichkeit, daß irgendein bestimmtes der 100 Kollektionen der Bakterien den gesamten Satz von 5 kritischen neuen Proteinen enthält ist deshalb $(1/2)^5 = 1/32$. Unter den 100 anfänglichen Bakteriensätzen werden ca. 3 die 5 kritischen Transformatoren enthalten. In jedem dieser Sätze ist die Gesamtzahl von neuen Genen eher nur 500 000 als eine Million. Durch aufeinanderfolgende Wiederholungen, deren Gesamtzahl im vorliegenden Fall ca. 20 ist, werden nach diesem Verfahren fünf kritische neue Gene isoliert. Die darauffolgende Mutagenese und Selektion dieses Satzes von 5 stochastischen Genen erlaubt eine Verbesserung der notwendigen katalytischen Funktionen. In einem Fall, in dem es notwendig ist, eine Sequenz von 20 Reaktionen zu katalysieren und 20 Gene, die neue Proteine kodieren, parallel dazu isoliert werden müssen, ist es ausreichend, die Multiplizität der Transformation so einzustellen, daß jeder Satz von 10^8 Bakterien 80% der 10^5 stochastischen Gene empfängt um 200 solcher Bakteriensätze zu verwenden. Die Wahrscheinlichkeit, daß alle 20 neuen Proteine in einem Satz vorgefunden werden, ist $0,8^{20} \approx 0,015$. Es werden deshalb ca. 2 von den 200 Sätzen, die die 20 neuen Gene besitzen, die notwendig sind, um die Bildung der Zielverbindung zu katalysieren. Die Zahl der für die Isolation der 20 neuen Gene erforderlichen Zyklen ist in der Größenordnung von 30.

Die vorstehend beschriebenen Prinzipien und Verfahren können vom Fall der Peptide auf verschiedene Gebiete der Chemie verallgemeinert werden, in denen chemische Reaktionen in einem wäßrigen Medium stattfinden bei Temperatur-, pH- und Konzentrationsbedingungen, die eine allgemeine enzymatische Funktion erlauben. In jedem Fall ist es notwendig, eine Untersuchungsmethode zu verwenden, um die Bildung der gewünschten Zielverbindung (Zielverbindungen) zu bestimmen. Es ist auch notwendig, eine ausreichend große Zahl von Aufbaublockverbindungen auszuwählen, um die Zahl der Reaktionssequenzen, die zu der Zielverbindung führen, zu erhöhen.

Das konkrete Beispiel, das für die Synthese eines Ziel-Pentapeptids angegeben wurde, kann auch wie folgt verallgemeinert werden.

Das beschriebene Verfahren erzeugt neben anderen Produkten stochastische Peptide und Proteine. Diese Peptide oder Proteine können katalytisch oder auf andere Weise, auf andere Verbindungen wirken. Gleicher-

maßen können sie auch die Substrate bilden, auf die sie einwirken. Es ist deshalb möglich, anhand der Fähigkeit solcher stochastischer Peptide oder Proteine, aufeinander einzuwirken, zu selektieren (oder zu screenen), und dabei die Konformation, die Struktur oder die Funktion von einigen von ihnen zu modifizieren. Auf ähnliche Weise ist es möglich, auf die Fähigkeit dieser Peptide und Proteine, unter sich selbst Hydrolyse, Kondensation, Transpeptidisierung oder andere Reaktionen, die die Peptide modifizieren, zu katalysieren, zu selektieren (oder zu screenen). Die Hydrolyse eines bestimmten stochastischen Peptids durch mindestens ein Glied des Satzes der stochastischen Peptide und Proteine kann z. B. verfolgt und durch radioaktive Markierung des bestimmten Proteins, gefolgt durch eine Inkubation mit einer Mischung des stochastischen Proteins in Gegenwart eines Ions, wie Mg, Ca, Zn, Fe, und ATP oder GTP gemessen werden. Das Auftreten radioaktiver Bruchstücke des markierten Protein wird dann wie beschrieben gemessen. Das stochastische Protein (Proteine), das diese Reaktion katalysiert, kann wieder, zusammen mit dem Gen (Genen), das es produziert, durch aufeinanderfolgende Diminution des Programms der transformierten Klone, wie oben beschrieben, isoliert werden.

Eine Ausweitung des Verfahrens besteht in der Selektion eines Ensembles stochastischer Peptide und Polypeptide, die fähig sind zur Katalyse eines Satzes von Reaktionen, die von den anfänglichen Aufbaublocken (Aminosäure und kleine Peptide) zu einigen der Peptide oder Polypeptide des Satzes führen. Es ist deshalb auch möglich, ein Ensemble zu selektieren, das zur Katalyse seiner eigenen Synthese fähig ist. Ein solcher reflektiver autokatalytischer Satz kann in einem Chemostaten eingerichtet sein, worin die Reaktionsprodukte konstant verdünnt werden, aber worin die Konzentration der Aufbaublocke konstant bleibt. Alternativ kann die Synthese eines solchen Satzes durch Einschluß des komplexen Satzes der Peptide in Liposomen mittels üblicher Methoden unterstützt werden. In einer hypertonen wäßrigen Umgebung, die solche Liposomen umgibt, verringert die unter Bildung größerer Peptide verlaufende Kondensationsreaktion den osmotischen Druck innerhalb der Liposome, treibt durch die Kondensationsreaktionen gebildete Wassermoleküle aus den Liposomen und begünstigt damit die Synthese größerer Polymerer. Die Existenz eines solchen autokatalytischen Ensembles kann durch zweidimensionale Gelelektrophorese und durch HPLC nachgewiesen werden, die die Synthese einer stabilen Verteilung von Peptiden und Polypeptiden zeigen. Das geeignete Reaktionsvolumen hängt von der Zahl der verwendeten molekularen Spezies ab und von den Konzentrationen, die notwendig sind, um die Bildung der Peptidbindungen gegenüber ihrer Hydrolyse zu begünstigen. Die Verteilung molekularer Spezies eines autokatalytischen Ensembles kann aufgrund des Entstehens verschiedener autokatalytischer Ensembles frei variieren oder geändert werden. Die Peptide und Polypeptide, die einen autokatalytischen Satz aufbauen, können bestimmte Elemente gemeinsam mit dem großen anfänglichen Ensemble (aufgebaut aus kodierten Peptiden und Polypeptiden wie durch unter Verfahren bestimmt) besitzen, können aber auch Peptide und Polypeptide enthalten, die nicht durch das Ensemble stochastischer Gene, die für das anfängliche Ensemble kodieren, kodiert sind.

Der Satz stochastischer Gene, dessen Produkte notwendig sind, um einen solchen autokatalytischen Satz zu schaffen, können wie beschrieben durch sequentielle Di-

minution des Programms der transformierten Klone isoliert werden. Zusätzlich kann ein autokatalytischer Satz kodierte Peptide enthalten, die anfänglich durch die stochastischen Gene kodiert sind und kontinuierlich in dem autokatalytischen Satz synthetisiert werden. Um diese kodierte Teilmenge von Peptiden und Proteinen zu isolieren, kann der autokatalytische Satz verwendet werden, um durch Immunisierung in einem Tier polyclonale Seren zu erhalten, die eine sehr große Zahl der Bestandteile des autokatalytischen Satzes erkennen.

Diese Seren können verwendet werden, um das Programm der stochastischen Gene zu screenen, um diese Gene zu finden, die Proteine exprimieren, die dazu fähig sind, mit den in den Seren vorhandenen Antikörpern zu kombinieren.

Dieser Satz stochastischer Gene exprimiert eine große Zahl von kodierten stochastischen Proteinen, die in dem autokatalytischen Satz weiterbestehen. Die verbleibenden der kodierten Bestandteile eines solchen autokatalytischen Satzes können durch fortgesetzte Diminution des Programms der stochastischen Gene isoliert werden, von denen die durch immunologische Methoden bestimmte Teilmenge zuerst entfernt wurde.

Solche autokatalytische Sätze von Peptiden und Proteine, die wie angegeben erhalten werden, können eine Zahl praktischer Anwendungen finden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Peptiden, Polypeptiden oder Proteinen mit einer spezifischen Eigenschaft, welches folgende Stufen umfaßt:
in einem gemeinsamen Milieu werden gleichzeitig Gene hergestellt;
die so erhaltenen Gene werden in Wirtszellen eingebracht;
die unabhängigen Klone der transformierten Wirtszellen, die die Gene enthalten, werden gleichzeitig kultiviert, um die Gene zu klonieren und die Bildung von Peptiden, Polypeptiden oder Proteinen, die durch jedes dieser Gene exprimiert werden, zu bewirken;
es wird ein Screening und/oder eine Selektion an solchen Klonen transformierter Wirtszellen durchgeführt, um die Klone zu identifizieren, die Peptide, Polypeptide oder Proteine mit mindestens einer spezifischen Eigenschaft bilden;
die so identifizierten Klone werden isoliert; und in einer Weise vermehrt, um mindestens ein Peptid, Polypeptid oder Protein mit der spezifischen Eigenschaft zu produzieren, dadurch gekennzeichnet, daß die Gene zumindest teilweise aus stochastischen synthetischen Polynukleotiden bestehen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Gene durch stochastische Copolymerisation der vierten Art von Deoxyphosphonukleotiden A, C, G und T gebildet werden, ausgehend von den zwei Enden eines vorher linearisierten Expressionsvektors, dann durch Bildung zweier kohäsiver Enden, um einen ersten Strang von stochastischer DNA zu bilden, der aus einem Molekül des Expressionsvektors aufgebaut ist, der zwei stochastische Sequenzen besitzt, dessen 3'-Enden komplementär sind, gefolgt von der Synthese des zweiten Stranges der stochastischen DNA.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Gene durch stochastische Copolymerisation von doppelsträngigen Oligonukleoti-

den, die keine kohäsiven Enden besitzen, in einer solchen Weise hergestellt werden, um Fragmente von stochastischer DNA zu bilden, gefolgt durch Ligierung dieser Fragmente in einem vorher linearisierten Expressionsvektor.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide eine Gruppe palindromischer Octamerer bilden.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Gruppe palindromischer Octamerer die folgende Gruppe ist:

5' GGAATTCC 3'

5' GGTCGACC 3'

5' CAAGCTTG 3'

5' CCATATGG 3'

5' CATCGATG 3'.

6. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide eine Gruppe palindromischer Heptamerer bilden.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Gruppe palindromischer Heptamerer die folgende Gruppe ist:

5' XTCGCGA 3'

5' XCTGCAG 3'

5' RGGTACC 3'

worin X = A, G, C oder T, und R = A oder T.

8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Eigenschaft die Fähigkeit ist, eine bestimmte chemische Reaktion zu katalysieren.

9. Verfahren nach Anspruch 1 zur Herstellung von verschiedenen Peptiden und/oder Polypeptiden, dadurch gekennzeichnet, daß die Eigenschaft die Fähigkeit ist, eine Sequenz von Reaktionen, die von einer bestimmten Gruppe anfänglicher chemischer Verbindungen zu mindestens einer Zielverbindung führen, zu katalysieren.

10. Verfahren nach Anspruch 3 zur Herstellung eines Ensembles, das aus mehr als einem Peptid, Polypeptid und/oder Protein besteht, das reflexiv autokatalytisch ist, dadurch gekennzeichnet, daß die Eigenschaft die Fähigkeit ist, die Synthese des Ensembles selbst, ausgehend von Aminosäuren und/oder Oligopeptiden zu katalysieren.

11. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Eigenschaft die Fähigkeit ist, selektiv die chemischen und/oder biologischen Eigenschaften einer bestimmten Verbindung zu modifizieren.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Eigenschaft die Fähigkeit ist, selektiv die katalytische Aktivität eines Peptids, Polypeptids oder Proteins zu modifizieren.

13. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Eigenschaft die Fähigkeit ist, mindestens eine biologische Funktion von mindestens einer biologisch aktiven Verbindung zu simulieren oder zu modifizieren.

14. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Eigenschaft ist, mindestens ein Epitop eines bestimmten Antigens ähnliches Epitop zu besitzen.

15. Verfahren nach Anspruch 11 und 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Eigenschaft die Fähigkeit ist, die Wirkungen eines biologisch aktiven Moleküls zu simulieren oder zu modifizieren und daß das Screening und/oder die Selektion der Klone transformierter Wirtszellen, die wenigstens ein Peptid, Polypeptid oder Protein mit dieser Eigenschaft produzieren, ausgeführt wird durch Herstellung von Antikörpern gegen das Molekül und Verwendung dieser so erhaltenen Antikörper, um diese Klone, die diese Peptide, Polypeptide oder Proteine enthalten, zu identifizieren, dann durch Vermehrung der so identifizierten Klone und Aufreinigung und Reinigung der durch diese Klone produzierten Peptide, Polypeptide oder Proteine und schließlich dadurch, daß man dieses Peptid (Peptide), Polypeptid (Polypeptide) oder Protein (Proteine) einer Untersuchung *in vitro* unterwirft, um festzustellen, daß es tatsächlich die Fähigkeit besitzt, die Wirkung dieses Moleküls zu simulieren oder zu modifizieren.

16. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß das Antigen EGF ist.

17. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Klone transformierter Wirtszellen, die Peptide, Polypeptide oder Proteine mit der spezifischen Eigenschaft produzieren, durch Affinitätschromatographie an Antikörpern, die einem Protein entsprechen, das durch das natürliche Fragment des DNA-Hybrids exprimiert ist, identifiziert und isoliert werden.

18. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Eigenschaft die Fähigkeit ist, an eine bestimmte Verbindung zu binden.

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung ausgewählt ist aus Peptiden, Polypeptiden oder Proteinen.

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteine Proteine sind, die die Transkriptionsaktivität oder Replikation der DNA regulieren.

21. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung ausgewählt ist unter den Sequenzen von DNA und RNA.

22. Verfahren gemäß Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß die erhaltenen Proteine die Fähigkeit besitzen, die Transkriptionsaktivität, die Replikation oder die Stabilität von DNA zu modifizieren.

23. Anwendung des Verfahrens gemäß Anspruch 14 oder Anspruch 15 zur Herstellung eines Impfstoffes.